

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭62-270162

⑬ Int.Cl.⁴
A 61 L 27/00

識別記号 庁内整理番号
C-6779-4C

⑭ 公開 昭和62年(1987)11月24日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 人工基底膜及びその製造方法

⑯ 特 願 昭61-4310

⑰ 出 願 昭61(1986)1月14日

⑱ 発 明 者 楠 慎 一 郎 東京都練馬区西大泉4-3-49

⑲ 発 明 者 瀬 川 辰 寿 東京都府中市小柳町2-31-6

⑳ 発 明 者 中 村 富 美 男 市川市塩浜4-2-21-203

㉑ 出 願 人 株式会社アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

明 細 書

1. 発明の名称

人工基底膜及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) コラーゲンゲル中で培養した繊維芽細胞を基板とし、その上にⅣ型コラーゲン、糖タンパク質、ムコ多糖を含む構成成分を重ねし、生理的条件下でゲル化させることを特徴とする人工基底膜の製造方法。

(2) 特許請求の範囲第1項に記載の方法で製造された人工基底膜。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、人工基底膜及びその製造方法に関する。基底膜は、上皮細胞、内皮細胞及び中皮細胞の基底面に存在するコラーゲンと糖蛋白質を主成分とする細胞間質である。現在、基底膜は癌の転移や上皮-間充織系における上皮細胞の増殖制御の調節等、生物学的に重要な役割を果たしていることが判明してきている。しかし、

この基底膜は *in vitro* で人工的に作成することは一般に極めて難しく、又、ラミニンタイプⅣコラーゲン、HSPGS(ヘパラン硫酸、プロテオグリカン等)を主成分として再構成させる方法では、生成された人工基底膜は生体組織内のものとは著しくその構造が異なっていた。

上記に鑑み、本発明者らはコラーゲンゲル内に繊維芽細胞をうめ込んだ凝結合膜上に、基底膜要素を重ね培養することで天然の基底膜と構造的に極めて均等な人工基底膜を製造することに成功した。また上記方法で作成した再構成基底膜上で皮膚由来上皮細胞を培養したところ、著しく優れた増殖能を示し、3週間経過時には、上皮細胞の均一な多層構造の形成を光学及び電子顕微鏡で観察することができた。さらに上述した培養皮膚をネズミに移植したところ、創傷治癒も著しく促進され、またケロイド状瘢痕も全く認められなかった。

以下、本発明の構成等につき詳細に分説する。

基底膜構成成分

本発明において、基底膜構成成分は適量の typeIV コラーゲン (BRL 社製)、ラミニン (BRL 社製)、及びフィブロネクチン (BRL 社製) を含む MEM 培地 10% FCS 溶液とした。

又、基板となる繊維芽細胞含有ゲルとしては、適量の typeI コラーゲン (またはアテロコラーゲン) を含む MEM 培地 10% FCS 溶液を使用した。尚、上記 2 溶液にヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ニドゲン及びエンタクチン等を微量に加えることにより、人工基底膜がより良好に製造できることも確認された。

再構成基底膜の製造

再構成基底膜は、使用対象に応じて構成因子の動物種を選択することが必要であるが、細胞性免疫を考慮すると基底膜内に極力細胞を含まないことが望ましい。

以上の見地から次のような方法で基底膜を製造した。

第 1 図は本発明再構成基底膜の製造方法の 1

らに再構成基底膜中に繊維芽細胞が混入することを防ぐことができる。

以下本発明を実験例により詳細に説明する。

実験例 I

前記方法で製造した再構成基底膜 6 ml 上に、1 枚あたり 6×10^4 個の繊維芽細胞を植え、5% CO₂、95% 大気、37℃ でゲルの収縮状態を観察した。ゲル収縮の度合は、基底膜上で培養している細胞の活発さと関係していることが、知られている。結果は第 3 図に示し、図中、横軸は移植後の日数、縦軸はゲルの直径 (cm) を表す。

実験例 II

前記方法で製造した再構成基底膜上に、モルモット皮膚上皮細胞を培養したところ著しく増殖し、3 週間経過した時点で上皮細胞の均一な多層構造が形成されることを光学及び電子顕微鏡で観察した。さらに上記の培養上皮細胞をモルモット背部に移植したところ、正常な角質の形成が観察され、さらに移植後 4 週間観察を

つを模式的に示したものであり、繊維芽細胞を組み込んだ typeI コラーゲンゲル 1 上に細胞を含まない typeI コラーゲンゲル 2 を重層、さらにその上に基底膜構成成分 3 を重層してある。このときの培養条件は 5% CO₂、95% 大気、37℃ とする。

尚、このとき 1 層と 2 層の間にミリポアフィルター (ミリポア社製) 等隔膜を挟み込むと、基底膜中への細胞の混入をさらに妨げることができる。

又、第 2 図に模式的に示した様に、繊維芽細胞を組み込んだ typeI コラーゲンゲル 1 上に基底膜成分 3 を重層し、5% CO₂、95% 大気で 7 日間培養後 5% CO₂、50% O₂、45% N₂ に条件を変えて 3 日間培養する方法も有効である。これは、繊維芽細胞が高酸素濃度下では増殖阻害される性質を利用したものである。この方法に従うと前記方法に比べ、繊維芽細胞と再構成成分とが直接接する機会が多いため、人工基底膜の構造を頑強にすることができ、さ

続けたところ移植片の拒絶反応はなく、また皮膚のひこう等のケロイド状瘢痕の形成は認められなかった。

以上から明らかな様に本発明は天然の基底膜と構造的に極めて均等な人工基底膜とその製造方法を提示したものであり、上皮系細胞の培養において著効を有するものと言ひ得る。

4. 図面の詳細な説明

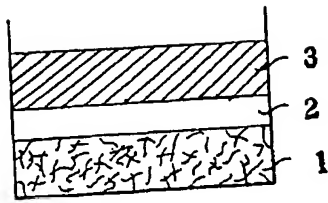
第 1 図及び第 2 図は本発明人工基底膜の製造方法を示した説明図である。

第 3 図は、実験例 I の結果を示す説明図である。

特許出願人 株式会社アドバンス開発研究所

第3図

第1図



第2図

